



NAPPO

North American Plant Protection Organization
Organización Norteamericana de Protección a las Plantas
MEXICO - USA - CANADA

Proyecto piloto para la armonización de protocolos de diagnóstico para plagas de semillas centrado en el virus del fruto rugoso café del tomate (ToBRFV)



Informe final preparado por el Grupo de expertos en semillas de la NAPPO y presentado al Comité Ejecutivo de la NAPPO

Mayo del 2023

Índice

Resumen ejecutivo	3
Introducción	4
Metodología y plan de trabajo	4
<i>Diseño experimental</i>	4
<i>Reactivos y paneles experimentales</i>	5
Resultados.....	5
<i>Límite de detección (LOD, por su sigla en inglés)</i>	5
<i>Especificidad</i>	6
<i>Sensibilidad</i>	7
<i>Precisión</i>	7
<i>Linealidad, exactitud y umbral de la muestra</i>	8
<i>Tasa de probabilidad</i>	9
Conclusiones y recomendaciones.....	10
Próximos pasos	10
Lecciones aprendidas	10

Resumen ejecutivo

- Para el proyecto piloto se seleccionaron cinco protocolos de diagnóstico que utilizan los países miembros de la NAPPO.
- Nueve laboratorios de la región de la NAPPO realizaron los experimentos.
- Los datos que generaron los laboratorios se utilizaron para evaluar los protocolos seleccionados.
- Según el análisis de los datos de la prueba de anillo:
 - Los protocolos **A** (CDFA: T. Tian. no publicado), **B** (protocolo de ISHI-Veg/NSHS), **C** (USDA-APHIS; Chanda *et al.*, 2021) y **D** (USDA-APHIS; Dey *et al.*, 2021) generaron resultados comparables y podrían recomendarse para utilizarlos como protocolos de diagnóstico intercambiables para la detección del ToBRFV en semillas de tomate y pimiento. Estos protocolos incluyen dos metodologías de PCR en tiempo real y dos de PCR convencional.
 - Además, los protocolos **B, C y D** *dieron resultados óptimos* en relación con todos los parámetros ensayados y las variables evaluadas.
- Según los resultados obtenidos, las tres ONPF de los países miembros de la NAPPO podrían considerar el uso de los protocolos **B, C y D** para las pruebas fitosanitarias de semillas con el fin de detectar la presencia del ToBRFV.
- Si las ONPF de los países miembros de la NAPPO utilizaran protocolos óptimos se evitaría que los países exportadores e importadores volvieran a realizar pruebas y por ende, se facilitaría el comercio interregional seguro y rápido de semillas de tomate y pimiento.
- El diseño experimental que se utilizó en este proyecto piloto puede servir de modelo para estudios futuros con la finalidad de evaluar otros protocolos de diagnóstico para la detección del ToBRFV o protocolos para otras plagas reglamentadas que se transmiten por semillas.

Introducción

En abril del 2022, el Comité Ejecutivo (CE) de la NAPPO aprobó los Términos de referencia (TdR) para el proyecto de la NAPPO titulado: «Proyecto piloto para la armonización de protocolos de diagnóstico para plagas de semillas centrado en el virus del fruto rugoso café del tomate (ToBRFV)». El documento de los TdR brindó información acerca de los motivos y los objetivos generales del proyecto, sugirió la metodología del proyecto, una lista de posibles laboratorios participantes, el presupuesto previsto y el plan de trabajo general y además ofreció una lista de los expertos en la materia (del gobierno y la industria) los cuales integraron el Grupo de expertos en semillas (GE) de la NAPPO. Se consideró como un requisito la aprobación de los TdR por parte del CE de la NAPPO para que el GE en semillas iniciara el diseño, la preparación, la ejecución y el análisis de los datos de este proyecto de sumo impacto.

El presente informe presenta un resumen de los resultados del proyecto. También incluye una sección acerca de las **Lecciones aprendidas** para considerarlas en proyectos futuros sobre armonización de protocolos de diagnóstico para plagas transmitidas por semillas en nuestra región, así como una sección de **Conclusiones y recomendaciones** fundamentada en los resultados del proyecto.

Metodología y plan de trabajo

Diseño experimental

Para evitar cualquier sesgo, los protocolos seleccionados para la detección y cuantificación del virus se nombraron A, B, C, D y E antes de suministrar todos los materiales de la prueba a los laboratorios participantes (véase el cuadro 1 más adelante). El análisis comparativo del rendimiento de los protocolos de diagnóstico basados en PCR que fueron seleccionados (**estudio del rendimiento de la prueba**) utilizó un formato de prueba de anillo. Se sometieron a ensayo tres protocolos de PCR convencional (cPCR) y dos de PCR en tiempo real (RT-PCR). Los paneles experimentales (muestras analíticas del ToBRFV, muestras de semillas de tomate y pimiento positivas y negativas y los controles) también se codificaron para disminuir al mínimo el sesgo durante la etapa experimental.

Cuadro 1. Protocolos de diagnóstico sometidos a prueba para el ToBRFV.

Código	Origen	Tipo
A	California Department of Food and Agriculture (Departamento de Alimentos y Agricultura de California, CDFA, por su sigla en inglés), T. Tian, protocolo inédito (protocolo sugerido por la Agencia Canadiense de Inspección Alimentaria (ACIA))	cPCR
B	Iniciativa Internacional de Salud de las Semillas para los Cultivos Vegetales /Sistema Nacional de EE. UU. para la Salud de las Semillas (ISHI-Veg/(NSHS, por su sigla en inglés). ¹	RT-PCR
C	Servicio de Inspección de Sanidad Agropecuaria del Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA-APHIS), Chanda <i>et al.</i> , 2021	RT-PCR
D	USDA-APHIS, Dey <i>et al.</i> , 2021	cPCR

¹ Protocolo de ISHI-Veg modificado y validado a través del Sistema Nacional para la Salud de las Semillas (NSHS, por su sigla en inglés).

E	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), Rodríguez Mendoza et al., 2019.	cPCR
---	---	------

Se elaboraron tres procedimientos operativos estandarizados (SOP, por su sigla en inglés) utilizando los códigos asignados a los protocolos y las muestras (cada una de las muestras suministradas se etiquetó de manera distinta en el SOP). Se crearon SOP de tal manera que cada uno de los laboratorios participantes sometiera a prueba todos los protocolos pero no todas las muestras fueron analizadas por cada laboratorios participantes. Las muestras se sometieron a prueba en duplicados y/o triplicados para capturar la variación que se produjo a raíz de la amplificación de la muestra en cada protocolo para cada laboratorio. También se evaluó la variación entre los diagnosticadores en cada uno de los laboratorios participantes.

Se elaboraron instrucciones adicionales sobre la forma de introducir en el Portal del laboratorio del APHIS los datos arrojados. La Secretaría programó varias sesiones de capacitación virtuales con los laboratorios participantes antes de iniciar la etapa experimental del proyecto.

Reactivos y paneles experimentales

Los paneles experimentales (= las muestras que se someterían a prueba) se prepararon y etiquetaron utilizando información codificada según el SOP que se había asignado a cada laboratorio participante. Se obtuvieron los permisos de importación para enviar los reactivos y los paneles experimentales desde el laboratorio en Estados Unidos, el cual reunió los materiales, a los laboratorios participantes en Canadá, México y Estados Unidos.

Antes de iniciar la etapa experimental, se solicitó a los laboratorios participantes completar una prueba preliminar para asegurar que los reactivos funcionaban con el ARN extraído por cada laboratorio. Esto era fundamental debido a que cada laboratorio utilizó su propio protocolo de extracción de ARN.

Resultados

Los laboratorios participantes realizaron la prueba y recolectaron los datos. Ocho laboratorios contribuyeron con una serie de datos completos para todos los parámetros de PCR en tiempo real que se evaluaron. Los datos de siete laboratorios determinaron un umbral de ciclos universal de 34 utilizando qRT-PCR. Se evaluaron los siguientes parámetros para todos los protocolos sometidos a prueba:

Límite de detección (LOD, por su sigla en inglés)

Se define como el porcentaje de muestras que contienen el blanco que se puede detectar (ToBRFV) en una concentración dada. Los valores fluctuaron entre 0 % para las muestras negativas (no hubo presencia del virus) a 100 % (todas las muestras que contenían el virus se pueden detectar en una concentración especificada). Los resultados del LOD para todos los protocolos se muestran en la Figura 1. Los Protocolos B, C y D arrojaron el LOD más bajo. Los protocolos B y C tuvieron un LOD del 50 % cuando se diluyó la muestra de diagnóstico 1 en 1000 mientras que el protocolo D tuvo un LOD del **79 %**.

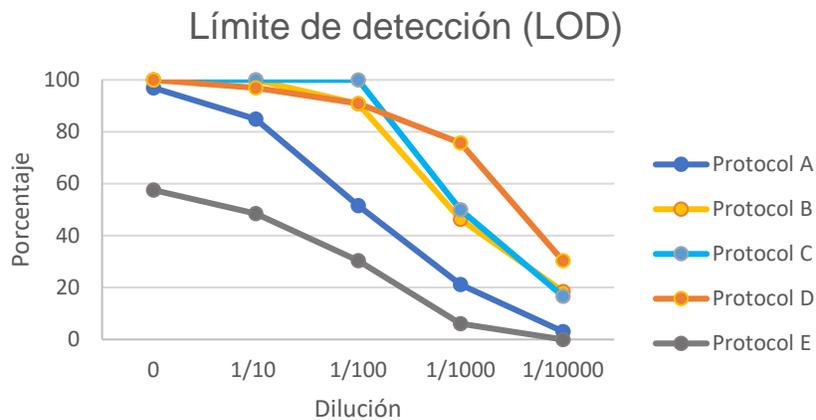


Figura 1. Límite de detección (LOD) para todos los protocolos sometidos a prueba (A-E) en extractos de ARN sin diluir hasta una dilución de 1 en 10000 que se extrajeron de las semillas de tomate infestadas del ToBRFV.

Especificidad

Se define como la amplificación cruzada o no específica del ensayo cuando se somete a prueba el material negativo. Para determinar la especificidad, se utilizaron tres tipos de muestras:

- se creó una muestra analítica de reacción cruzada mediante el uso de una plantilla sintética del virus del mosaico moteado del tomate (ToMMV) el cual está estrechamente emparentado con el ToBRFV. Esta muestra se sometió a prueba en concentraciones elevadas y bajas del virus.
- semillas de tomate sanas (que no están infectadas de ToBRFV).
- semillas de pimientos sanas (que no están infectadas de ToBRFV).

Todos los protocolos arrojaron niveles de especificidad comparables sin importar una posible concentración de patógenos en contaminación cruzada o la matriz del hospedero. Se encontró una diferencia significativa en la especificidad, solamente en muestras de semillas de pimiento sanas en el protocolo B. La determinación del motivo de esta diferencia estaba fuera del ámbito del estudio (podría estar relacionada con la matriz del hospedero o la posible presencia de un patógeno que no fuera el ToMMV o ToBRFV) (cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de la prueba de especificidad para los protocolos A-E utilizando muestras analíticas del ToMMV y controles de semillas de tomate o pimiento sanas. Los resultados arrojados son porcentaje negativo \pm con un intervalo de confianza del 95 %.

	PCR convencional			PCR cuantitativo en tiempo real	
	A	D	E	B- proteína de la cubierta	C
Muestras que se utilizaron para someter a prueba la especificidad					
Reacción cruzada de muestra analítica con concentración elevada del virus del ToMMV. Transcrito <i>in-vitro</i> en agua	83.3 \pm 13.9	100.0 \pm 3.9	100.0 \pm 3.9	100.0 \pm 1.6	92.6 \pm 4.1

de grado de biología molecular					
Reacción cruzada de muestra analítica con concentración baja del virus del ToMMV. Transcrito <i>in-vitro</i> en agua de grado de biología molecular	77.8±10.3	94.4±11.1	100.0±5.1	100.0±1.6	91.7±3.8
Semillas de tomate sanas	100.0±4.6	95.8±11.9	100.0±4.6	100.0±1.8	100.0±2.8
Semillas de pimientos sanas	96.3±11.3	100.0±4.4	100.0±4.6	77.8±3.6	100.0±3.5

Sensibilidad

La sensibilidad se define como la medición de los resultados positivos reales en una serie de muestras sometidas a prueba (porcentaje de detección del material positivo al ToBRFV). Los protocolos B, C y D dieron resultados óptimos, con un porcentaje elevado de sensibilidad en comparación con los protocolos A y E (figura 2).

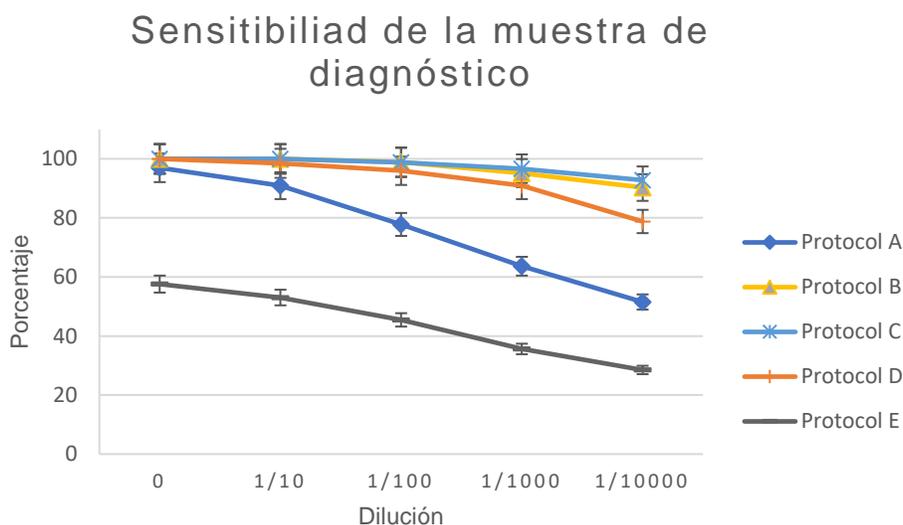


Figura 2. Resultados de la sensibilidad de las muestras de diagnóstico para los protocolos A-E (semillas de tomate infestadas de ToBRFV). Los porcentajes de sensibilidad son para los extractos de ARN sin diluir hasta una dilución de 1 en 10000 que se extrajeron de semillas de tomate infectadas de ToBRFV.

Precisión

La precisión es la evaluación de la variabilidad del ensayo entre las pruebas. Se evaluó la precisión únicamente para los dos protocolos de RT-PCR (B y C). Se evaluaron tres categorías:

- repetibilidad - para evaluar las repeticiones en la misma prueba
- precisión intermedia - para evaluar las repeticiones entre los diagnosticadores en el mismo laboratorio
- reproducibilidad – repeticiones combinadas de todos los laboratorios.

Las tendencias de las categorías indicadas anteriormente fueron tal como se previeron. Se evaluó el porcentaje de la variabilidad por el porcentaje del coeficiente de variación (desviación estándar dividida por el promedio y multiplicada por 100; CV). La repetibilidad era inferior al 2 % de CV, la precisión intermedia fluctuó entre 3.55 y 4.38 % de CV y la reproducibilidad fue inferior al 9 %. Los resultados se encuentran en general dentro de los límites aceptados ([fuente 1](#), [fuente 2](#), [fuente 3](#), [fuente 4](#)) e indican una buena precisión del ensayo (cuadro 3).

Cuadro 3. Parámetros para determinar la precisión del ensayo para cada uno de los blancos de los protocolos B y C.

Variables para determinar la precisión del ensayo (valores en %)			
Protocolo	Repetibilidad	Precisión intermedia	Reproducibilidad
B- gen de la proteína de movimiento	1.65	3.55	8.57
B- gen de la proteína de la cubierta	1.53	3.73	8.58
B-nad5 de la planta	1.43	4.38	5.11
C- gen de la proteína de movimiento	1.85	4.01	8.68
C- nad5 de la planta	1.67	3.73	7.73

Linealidad, exactitud y umbral de la muestra

Se determinó la **linealidad** mediante una curva de calibración de cinco puntos para cada laboratorio. Se necesitaron por lo menos tres puntos de concentración para establecer una curva y obtener un coeficiente de determinación (r^2), el cual midiera qué tan lineales se encontraban los puntos en la curva (cuadro 4). Una curva perfecta ($r^2=1.0$) sugiere que hay muy poca o ninguna variabilidad entre las diluciones en serie. Los valores de los siete laboratorios tuvieron $r^2>0.99$, lo cual sugiere que es apropiado para una curva de calibración de cinco puntos de un laboratorio. Las curvas de calibración se utilizaron para determinar la **exactitud** y el **umbral de la muestra** para los protocolos B y C (cuadro 4).

La **exactitud** de una curva de PCR en tiempo real es la pendiente de la curva de calibración. La exactitud perfecta, o un 100 %, está arraigada a una pendiente de -3.32. La pendiente representa el cambio del valor del ciclo en cuanto disminuye la concentración o -3.32 ciclos (ΔCq), por punto de la curva de calibración. En cuanto aumenta o disminuye la pendiente de ΔCq a partir de este valor, la exactitud disminuye. Una exactitud aceptable es de ± 0.3 , a partir de un valor que oscila entre -3.02 y -3.62. Los siete laboratorios evaluados produjeron pendientes dentro de los límites previstos.

Se determinó el **umbral de la muestra** mediante la resta de 3.32 del límite del ensayo previsto (valor del ciclo del final de la medición prevista) para cada uno de los siete laboratorios evaluados y se restó la pendiente generada del límite del ensayo para cada laboratorio. El valor del **umbral de la muestra** determinó si el valor de la muestra, cuando se evaluó frente a la curva del calibrador, era positivo o negativo.

En resumen, las curvas de calibración para los siete laboratorios evaluados podrían aplicarse para realizar de manera precisa las determinaciones de la muestra positiva o negativa para los protocolos B y C.

Cuadro 4. Linealidad y exactitud de los resultados de siete laboratorios participantes. Una buena linealidad se indica con un valor r^2 mayor de 0.98. Se prevé que la exactitud (pendiente de la curva de calibración) sea alrededor de -3.32 ± 0.3

Laboratorio	Linealidad (r2)	Exactitud (ΔC_d)
1	0.9957	-3.18
2	0.9995	-3.38
3	0.9983	-3.38
4	1.0000	-3.33
5	0.9964	-3.37
6	0.9967	-3.48
7	0.9986	-3.27

Tasa de probabilidad

Las tasas de probabilidad positivas (PLR) y negativas (NLR) se utilizaron para demostrar que cada prueba funcionaba de manera apropiada. Las tasas PLR y NLR constan de todos los puntos válidos de los datos de la muestra (p. ej., las tasas PLR y NLR del protocolo A reflejan los datos válidos generados por todos los laboratorios). Cuanto más cerca se encuentren estos valores a 1, será más difícil que la prueba distinga las muestras positivas y negativas. Una tasa PLR superior a 5 y una NLR inferior a 0.5 confirman alguna capacidad de distinguir las muestras positivas de las negativas (cuadro 5).

Cuadro 5. Tasa de probabilidad para los protocolos A-E. El protocolo B se sometió a prueba en cuanto a las regiones de la proteína de movimiento (MP) y de la cubierta (CP). Se calcularon los valores para la semilla infectada de ToBRFV, muestras de semillas de tomate y de pimiento sanas.

Protocolo	Tasa de probabilidad positiva (PLR, por su sigla en inglés)	Tasa de probabilidad negativa (NLR)
A	28	0.49
B (blanco 1 y 2)	17	0.08
C	29	0.07
D	38	0.22
E	6 ^(*)	0.72 ^(*)

(*): Tal como se indicó anteriormente, una PLR baja (cerca de 5 o inferior a este) y una NLR alta (superior a 0.5) sugieren dificultades para que el protocolo produzca resultados comparables cuando lo utilicen distintos laboratorios.

En el cuadro 6 se encuentra el nivel de confianza en los resultados cuando una muestra se sometió a prueba con los cinco protocolos. Por ejemplo, hay un nivel de confianza del 91 % de que la evaluación de la muestra analítica (primera fila en el cuadro 6) tenga un 97.2 % o mayor posibilidad de ser positiva al ToBRFV.

Cuadro 6. Verificación de la constancia de la matriz de la muestra

Muestra	Dilución	Nivel de confianza (CL) (%)	Probabilidad de que la muestra se identifique exactamente
Transcrito in vitro de ToBRFV en agua de grado de biología molecular	Sin diluir	91	97.2 %
	1/10	91	94.2 %
	1/100	91	91.5 %
	1/1,000	91	88.8 %
	1/10,000	91	82.7 %
Transcrito <i>in-vitro</i> de virus no blanco	Alto	91	89.6 %

Transcrito <i>in-vitro</i> de virus no blanco	Bajo	91	85.7 %
Muestras de semillas de tomate infectadas de ToBRFV	Sin diluir	93	85.6 %
	1/10	93	83.8 %
	1/100	93	79.2 %
	1/1,000	93	72.4 %
	1/10,000	93	65.5 %
Semillas de tomate sanas		91	92.8 %
Semillas de pimientos sanas		91	91.8 %

Conclusiones y recomendaciones

Las conclusiones y recomendaciones más relevantes se exponen en el resumen ejecutivo del presente informe. Entre las conclusiones y recomendaciones adicionales se incluyen las siguientes:

- El gen mitocondrial de plantas nad5 de blanco utilizado como control interno se amplificó de manera exitosa en todos los protocolos sometidos a prueba (dos PCR en tiempo real y un PCR convencional).
- Debería considerarse la posibilidad de invitar a otros países fuera de la región de la NAPPO a participar en estudios futuros de pruebas de anillo, especialmente centrados en los países con los cuales la NAPPO mantiene relaciones comerciales.

Próximos pasos

Como se indicó en los Términos de referencia aprobados, con la conclusión de la prueba de anillo y la aprobación de este informe de parte del Comité Ejecutivo de la NAPPO, el GE en semillas de la NAPPO reunirá a un subgrupo pequeño de expertos en la materia para que redacten un manuscrito y lo publiquen en una revista científica. Con la publicación del manuscrito se concluirá el proyecto y se disgregará el grupo pequeño del GE en semillas de la NAPPO.

Lecciones aprendidas

Este ha sido el proyecto más complejo de la NAPPO que la Secretaría ha llevado a cabo desde que se trasladó a Raleigh, Carolina del Norte. Dicho proyecto fue dirigido por uno de los grupos de expertos más grande de la NAPPO. Esto trajo consigo desafíos para la Secretaría en cuanto al manejo eficaz del GE, el cumplimiento de las fechas límites del proyecto y temas relacionados con la toma de decisiones y los aspectos logísticos del proyecto. A continuación, presentamos algunos puntos claves que podrían tomarse en cuenta para proyectos futuros de una naturaleza similar, incluidos aquellos que tienen como objetivo la evaluación de otros patógenos/sistemas de diagnóstico:

- Un GE más pequeño con excelente representación de las ONPF e industria mejoraría su manejo, coordinación y la toma de decisiones.
- Los subgrupos con tareas específicas demostraron ser una forma eficaz de progresar con el trabajo asignado al GE. Sin embargo, en vez de contar con subgrupos que trabajaran de manera lineal, sugerimos, mientras sea posible contar con subgrupos que trabajen simultáneamente en algunas tareas para ahorrar tiempo.
- Cuando sea posible, deberían tomarse decisiones importantes mediante un sistema de votación.

- Los miembros especiales que se asignaron a tareas específicas demostraron ser una estrategia valiosa y eficaz para alcanzar los objetivos primordiales del proyecto.
- Resultó valiosa la elaboración de directrices específicas para el documento y el intercambio de datos desde el inicio del proyecto. Estas deberían incluir las funciones y responsabilidades de los participantes.
- La responsabilidad de la preparación del proyecto en relación con la documentación debería caer bajo la responsabilidad de futuros GE de semillas.
- No se realizaron reuniones presenciales debido a la pandemia de la COVID 19. Sin embargo, sugerimos que se incluyan reuniones presenciales en proyectos futuros. Una reunión presencial sería extremadamente valiosa en los primeros 3 a 4 meses del proyecto para acelerar la asignación y la planificación de las funciones.